

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460097

研究課題名(和文) 腫瘍の成長に伴う腫瘍微小環境の変化のシステム解析

研究課題名(英文) Analysis and modeling of the effect of microenvironment on tumor growth.

研究代表者

齋藤 さかえ (SAITO, Sakae)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：20335491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境は、腫瘍を構成している細胞の種類と割合、構造から生じる低酸素などの物理的ストレス、環境によって誘導される細胞の遺伝子発現変化などが組み合わさったバランスの上に成り立っている。本研究では腫瘍微小環境をシステムとしてとらえ、腫瘍内のがん細胞、間質細胞の遺伝子発現およびストレス環境の局在が腫瘍の成長に伴ってどのように変化しているのかを明らかにし、腫瘍の状態を可視化する数理モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment is composed of non-cancer cells, such as vascular endothelial cells and immune cells, which are exposed to hypoxic and nutritional stress in tumor. The cellular stress response plays an important role in cell survival under stress conditions and results in tumor progression. To show the impact of microenvironment on tumor growth and morphology, we disclosed the intra-tumor heterogeneity by single cell analysis, and presented a numerical model for tumor growth and angiogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌 ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞：固形腫瘍では、がん細胞の増殖に対して血管形成の速度が伴わず、腫瘍内部には低酸素や低栄養といったストレス環境が存在する。これに対して、がん細胞にはストレスに対する適応応答の機構が存在し、厳しい環境下での生存を可能にしている。これまでの研究により、ストレス応答の分子機構が解明され、低酸素誘導因子を中心とした低酸素応答や、小胞体に局在するストレスセンサー分子を介した小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response; UPR) などのシグナル伝達経路が存在していることが明らかにされてきた。こうしたシグナル伝達経路の活性化は、がん細胞の悪性化や抗がん剤耐性の一因と考えられている。

(2) がん間質細胞：一方、腫瘍組織を観察すると、がん細胞の周囲には線維芽細胞、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞、血管やリンパ管の構成細胞などが浸潤している。最近の研究から、腫瘍内に存在する間質細胞は、がん幹細胞ニッチの構築、がん細胞の増殖の制御、さらには浸潤や転移の制御に関与していることが明らかになり、腫瘍の発生と増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。臨床研究においても、腫瘍浸潤細胞と治療効果や予後との関連を示す報告が数多くあり、腫瘍微小環境を構成している免疫細胞の種類やマーカー分子の発現を指標にがんの分類と診断を行う試みも始まっている。

(3) がん細胞と間質細胞との相互作用：腫瘍の増殖性、浸潤性や転移性といった性格は、がん細胞の特性のみで決まるものではなく、腫瘍微小環境におけるがん細胞と間質細胞の相互のバランスによって決まっていると考えられる。これまでの報告から、ストレス応答のシグナル伝達経路の下流で多数の炎症性因子の発現が誘導されており、低酸素応答や小胞体ストレス応答を介して、がん細胞が自身の増殖に有利な環境を作り出していることが示唆されている。しかし、がん間質細胞がどのようにして生じるのかなど不明な点も多く、がん細胞と間質細胞との相互作用の基盤となる分子機序の解明が課題とされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍微小環境を構築する要素として、がん細胞、間質細胞およびストレス環境の3つに着目し、腫瘍の増殖性と腫瘍微小環境の変化との関係を担がんマウスを用いて明らかにする。また、実測されたデータを利用し、腫瘍微小環境の変化を評価する数理モデルの構築を目指す。

(1) 腫瘍の成長に伴う間質細胞の種類およびストレス領域の変動の解析：細胞表面マ-

ーカーの発現をフローサイトメトリーにより解析し、腫瘍に浸潤する間質細胞の種類と数の変化を明らかにする。また、イメージングプローブおよび細胞のストレス応答の活性化を検出するレポーター遺伝子システムを用い、腫瘍内のストレス領域の割合と局在を明らかにする。

(2) ストレス領域のがん細胞およびがん間質細胞における遺伝子発現変化の解析：ストレス領域にあるがん細胞および間質細胞をそれぞれ単離して網羅的遺伝子発現解析を行い、生体内で活性化しているシグナル伝達経路や、間質細胞の浸潤および機能の変化に関わる因子を同定する。これらの解析により、腫瘍内のストレス環境が腫瘍の増殖に与える影響を明らかにする。

(3) 腫瘍微小環境を評価するモデルの構築：永山らの開発した腫瘍増殖シミュレータ (引用文献 ~) により腫瘍の成長に伴う細胞の増殖および血管新生を画像化し、腫瘍微小環境の変化を可視化できる数理モデルを構築する。また、(1)、(2)で明らかにした各因子の変動のデータとシミュレーションを比較し、腫瘍微小環境の変化のスコア化と腫瘍の増殖性との関連について検討する。

3. 研究の方法

Lewis 肺がん由来 3LL 細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植した担がんマウスを用い、腫瘍の成長に伴う腫瘍微小環境の変化を経時的に解析する。腫瘍からがん細胞および間質細胞を単離し、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析および次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を実施する。腫瘍内のストレス領域の検出にはイメージングプローブを使用し、細胞のストレス応答の活性化の検出にはすでに構築済みの小胞体ストレス下で特異的に生じる転写因子 XBP1 の mRNA スプライシングを利用した蛍光タンパク質発現レポーターシステムを活用できる。これらの技術を活用し、腫瘍内部のストレス領域にある細胞の機能を明らかにする。また、解析により得られたデータ (腫瘍サイズ、細胞数、ストレス領域の割合など) と数理モデルによるシミュレーション結果とを比較検討し、より正確なシミュレーションのために、数理モデルの種々のパラメータについて検討する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍を構成する細胞の単離と解析：腫瘍に浸潤する間質細胞の種類と数の変動を明らかにするため、移植後 4 日目、8 日目、12 日目の腫瘍を摘出して酵素で消化し、単一細胞を各種表面マーカーに対する蛍光標識抗体で多重染色して、フローサイトメトリーによって解析した。3LL 腫瘍へ浸潤する細胞の 70-80% を占めたのが CD11b 陽性 Gr-1 陽性の

ミエロイド由来サプレッサー細胞 (Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) であり、好中球・マクロファージが主な細胞であることがわかった。好中球 (CD11b⁺ Gr-1⁺ Ly-6C^{int}) および炎症性マクロファージ (CD11b⁺ Gr-1^{lo} Ly-6C^{hi}) の浸潤は4日目最も高く、徐々に割合が減っていくのに比べ、常在性マクロファージ (CD11b⁺ Gr-1^{lo} Ly-6C^{lo}) の割合は腫瘍の成長に伴って増加し、12日目には炎症性マクロファージより多くなる。MDSCs の中には強力な免疫抑制活性をもつ細胞がいることが知られおり、増加してくる常在性マクロファージの中に抑制性の因子を発現している細胞があるのではないかと考えられた。

続いて、腫瘍内部のストレス領域の割合の経時的な変化を明らかにするため、低酸素イメージングプローブ Hypoxyprobe を担がんマウスに経口投与し、低酸素領域にある細胞を標識した。切除した腫瘍から細胞を単離して抗 Hypoxyprobe 抗体および各種表面マーカーに対する蛍光標識抗体で多重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。移植後4日目、8日目、12日目の腫瘍を解析した結果、がん細胞の3~10%およびマクロファージの1~4%が低酸素プローブ陽性で検出されることがわかった。また、組織免疫染色によってこれらの細胞の局在を明らかにし、腫瘍血管から離れた場所に低酸素プローブ陽性細胞が局在することを確認できた。

(2) 腫瘍のストレス領域に局在する細胞の遺伝子発現解析：腫瘍内部の低酸素領域に局在する細胞集団が腫瘍の増殖や血管新生にどのような影響を与えているのかを明らかにするため、腫瘍から単離・分取したがん細胞及び間質細胞から mRNA および DNA を精製し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析および遺伝子のターゲットシーケンスを行った。移植直後のサイズの小さな腫瘍からはごくわずかな数の細胞しか単離できないことから、単一細胞からでも遺伝子発現解析を行うことのできる実験系を確立し、腫瘍内において個々の細胞がどのような遺伝子を発現しているのかを調べた。低酸素プローブ陽性のがん細胞の割合は腫瘍の成長に伴って3~10%まで増加し、これらの細胞で低酸素応答や小胞体ストレス応答などのストレス応答に関わるシグナル伝達経路が活性化していることが示された。腫瘍に浸潤したマクロファージでは、低酸素プローブ陽性の細胞の一部で VEGF, IL-10 など腫瘍関連マクロファージのマーカー遺伝子の発現が認められた。個々の細胞を比べると、マクロファージの遺伝子発現はがん細胞に比べてゆらぎが大きく不均一であることが示された。また、低酸素プローブ陰性マクロファージにも小胞体ストレス応答が活性化している細胞があり、ストレス感受性の違いや低酸素以外の誘導因子が関与している可能性が示唆

された。低酸素プローブ陽性の細胞で特に強い発現誘導が認められた血管内皮細胞増殖因子 VEGF および腫瘍増殖因子 TGF- β については定量 PCR および組織免疫染色によっても結果を確認し、発現の高い細胞が低酸素領域に局在していること、また、その割合が一致することが示された。

(3) 腫瘍微小環境を評価するモデルの構築：実験により得られた生物学的データを利用した腫瘍微小環境のモデル化を目指し、腫瘍におけるがん細胞の増殖と血管新生について数値シミュレーションによる解析モデルを構築した。永山らの開発した腫瘍増殖シミュレータを担がんマウスモデルに応用し、血管の初期配置、血管からの酸素拡散距離、がん細胞の初期数について、シミュレーションを繰り返しながら値を設定した。また、十分な解像度のシミュレーションを効率的に実施するため、1つの粒子が含む細胞数の設定についても検討した。これらの結果、移植後12日目までの腫瘍増殖について、がん細胞の増殖、血管増殖などの腫瘍の形状をシミュレーションし、血管誘導因子の分布、低酸素領域の分布、栄養分布、腫瘍圧力分布を画像化し予測できる数理モデルを構築することができた。

続いて、実験において成長した腫瘍の内部に壊死が観察されることから、がん細胞の壊死の発生を再現できる数理モデルの構築を行った。腫瘍内部の栄養分布の予測データから低栄養状態の領域を壊死状態と判定し、壊死の領域を画像化することができた。また、数理モデルより得られた結果を組織免疫染色やフローサイトメトリーによる解析結果と比較し、腫瘍の形状、腫瘍血管の分布、低酸素領域の分布、壊死の発生領域の分布が再現できていることを確認できた。腫瘍微小環境の可視化の試みは臨床データを用いても検討が進められており、予後予測のための研究への活用が期待される。

<引用文献>

Katsuya Nagayama, Yuki Oshiumi, Masayuki Yumita. 3D particle simulation on cancer growth and angiogenesis: using 2D blood vessel image. 2012 Spring World Congress on Engineering and Technology (SCET2012), 352-355, 2012.

Katsuya Nagayama, Hiroki Tomita, Ichiro Miura. 3D numerical simulation of blood vessel network on angiogenesis in cancer using a particle model. Theoretical and Applied Mechanics Japan, 60, 353-357, 2011.

Katsuya Nagayama, Junya Nitta, Ichiro Miura. Numerical Analysis on Angiogenesis in Cancer Using a Particle Model. Theoretical and Applied Mechanics Japan,

58, 321-324, 2009.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計7件)

Sakae Saito, Ikuko N Motoike, Kengo Kinoshita, Jun Yasuda, Hirofumi Ishii, Masayuki Yamamoto, Integrated genomics characterization of non-small cell lung cancer cell lines, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2016年2月16日~2016年2月20日, Maui, Hawaii USA.

齋藤さかえ、永山勝也、腫瘍内細胞のシングルセル解析、NGS現場の会第4回研究会、2015年7月1日~2015年7月3日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Yukio Nagamizu, Youhei Tajima, Katsuya Nagayama, Ichiro Miura, Sakae Saito, Particle Simulation on Cancer Growth and Angiogenesis - Modeling of stroma cells, The Third BMIRC International Symposium for Virtual Physiological Human, 2015年3月5日~2014年3月6日、のがみプレジデントホテル(福岡県飯塚市)

永山勝也、齋藤さかえ、三浦一郎、立野玲子、小倉潔、腫瘍成長と血管新生の3D粒子シミュレーション-壊死に関する研究-、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~2014年9月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Sakae Saito, RNA sequencing and whole transcriptome analysis of tumor-associated monocytes, Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2014年9月9日~2014年9月12日, Nairobi, Kenya.

Hiroto Nakata, Yuki Oshiumi, Katsuya Nagayama, Ichiro Miura, Sakae Saito Particle simulation of cancer growth and angiogenesis based on the image of mouse, The Second BMIRC International Symposium on Advances in Bioinformatics and Medical Engineering: In Memory of Professor Akinori Sarai, 2014年1月29日~2014年1月30日、福岡県立飯塚研究開発センター(福岡県飯塚市)

永山勝也、三浦一郎、齋藤さかえ、立野玲子、小倉潔 腫瘍増殖の3次元粒子シミュレーション-細胞増殖と血管新生の相互作用モデル、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日~2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ等

永山研究室 HP

http://www.nl.mse.kyutech.ac.jp/07_cancer.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 さかえ (SAITO, Sakae)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：20335491

(2)研究分担者

永山 勝也 (NAGAYAMA, Katsuya)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：70363398